植物分类学报 37(4):407~416(1999)
Acta Phytotaxonomica Sinica

核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用*

[1]王建波 [2]张文驹 [2]陈家宽
[1](武汉大学生命科学学院 武汉 430072)
[2](复旦大学生物多样性研究所 上海 200433)

Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms

[1]WANG Jian-Bo [2]ZHANG Wen-Ju [2]CHEN Jia-Kuan
[1](*College of Life Sciences, Wuhan University*, Wuhan 430072)
[2](*Institute of Biodiversity, Fudan University*, Shanghai 200433)

Abstract Nuclear rRNA genes (rDNA) in angiosperms are arranged in long tandem repeating units, much like those of other higher eukaryotes. Owing to rapid concerted evolution, the repeat units have homogenized or nearly so in most species. The internal transcribed spacer (ITS) of nuclear rDNA is composed of ITS1 and ITS2, which are seperated by 5.8S rDNA. The two spacers, ITS1 (187~298 bp) and ITS2 (187~252 bp), can be readily amplified by PCR and sequenced using universal primers. The sequences contain many variable sites and potential informative sites among related species, and have been proven to be a useful molecular marker in phylogenetic and evolutionary studies of many angiosperm taxa. It can be used not only in classification and phylogenetic inferences at the levels of family, subfamily, tribe, genus and section, but also in reconstruction of reticulate evolution and detection of the speciation via hybridization and polyploidization. But this region may not be useful for resolving phylogenetic relationships among families or taxa of higher hierarchy owing to the rapid variation of the ITS sequences.

Key words ITS sequence; Phylogenetics; Evolution; Angiosperm

摘要 被子植物与其它高等真核生物相似,核 rDNA 是高度重复的串联序列。由于同步进化的力量,绝大多数物种中这些重复单位间已发生纯合或接近纯合。核 rDNA 的内转录间隔区(ITS)包含被 5.8S rDNA 所分隔的 ITS1 和 ITS2 两个片段, ITS1 的长度为 187~298 bp, ITS2 为 187~252 bp,经 PCR 扩增后可以方便地对这两个片段进行直接测序或克隆测序。ITS 序列变异较快,可以提供较丰富的变异位点和信息位点,已证实它是研究许多被子植物类群系统与进化的重要分子标记,不仅可用于解决科、亚科、族、属、组内的系统发育和分类问题,而且可用于重建多倍体复合体的网状进化关系,探讨异源多倍体的起源过程,然而,正是由于 ITS 序列变异较快,它一般不适于科以上水平的系统发育研究。

关键词 ITS 序列; 系统发育; 进化; 被子植物

现代分子生物学技术的迅速发展,为系统与进化植物学研究提供了丰富而翔实的资料,为解决分类学、系统发育、物种形成与进化等方面的难题提供了极为有力的技术途径(汪小全,洪德元,1997; Soltis & Soltis, 1993)。前些年的研究中,除了涉及到核总 DNA

* 国家自然科学基金资助项目(39770056)。
1998-10-05 收稿,1999-02-09 收修改稿。

(顾红雅,1994;Wang *et al*.,1992)、核 5S、18S、26S rDNA(如 Pillay, 1997; Cronn *et al*., 1996; Hamby&Zimmer, 1992; Sastri *et al*., 1992; Dvorak *et al*., 1989; Appels & Honeycutt, 1986)、线粒体 DNA(如 Second & Wang, 1992)等之外, 主要是叶绿体 DNA(cpDNA)的酶切位点和序列变异(如陈之端等, 1998; 汪小全, 洪德元, 1997; Pillay & Hilu, 1995; Olmstead & Plamer, 1994; Soltis *et al*., 1993)。

诚然, cpDNA 的研究为探讨科及科以上分类阶元的系统发育关系提供了重要依据, 并将在这方面的研究中继续发挥重要作用(Olmstead & Palmer, 1994), 但由于 cpDNA 的进化速率远低于核基因组(Wolfe *et al*., 1987), 这就限制了其在低级分类阶元(如属、亚属)的应用, 尤其是对于关系非常密切及近期才发生分化的分类群, cpDNA 就无能为力了(Hsiao *et al*., 1995a, 1994)。此外, cpDNA 是细胞质 DNA, 是通过母系单向遗传的, 而种间杂交常常是双向的(Grant, 1981), 这样, 基于 cpDNA 的系统发育关系研究就往往不能反映物种间的进化方向, 无法解决高等植物中广泛存在的杂交和多倍化现象(Ainouche & Bayer, 1997)。

鉴于上述原因, 有些研究者的兴趣已转向寻找核基因组中进化较快的 DNA 片段, 而 18S-26S 核 rRNA 基因的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)正符合这一要求, 从而成为系统与进化植物学研究中的重要分子标记(Ainouche & Bayer, 1997; Kollipara *et al*., 1997; Baldwin *et al*., 1995; Hsiao *et al*., 1994)。

1 18S-26S rRNA 基因的基本结构

高等植物中的 rRNA 基因(rDNA)是高度重复的串联序列单位, 18S、5.8S 和 26S rDNA联结在一起, 作为一个转录单位, 而 5S rDNA 则位于另外的位点(关于 5S rDNA 的进化可参阅 Sastri *et al*., 1992 的综述)。18S-26S rDNA 在植物中有一至数个位点(Badaeva *et al*., 1996; Wendel *et al*., 1995; Jiang & Gill, 1994; Rogers & Bendich, 1987), 拷贝数可达 500～40000 (Rogers & Bendich, 1987), 基本结构如图 1 所示, 由 18S rDNA、26S rDNA、5.8S rDNA 和位于三者之间的基因内转录间隔区(ITS)组成, 其中 ITS 区由被 5.8S rDNA 所分隔的 ITS1 和 ITS2 两个片段组成。ITS1、ITS2 的转录产物在 rRNA 加工过程中被切掉, 但这两个片段在 rRNA 成熟过程中具有重要作用。

ITS 之所以成为被子植物系统与进化研究中的重要分子标记, 主要基于以下两个方面原因。第一, 作为 18S-26S rDNA 的一个组成部分, ITS 在核基因组中是高度重复的, 而且通过不等交换和基因转换, 这些重复单位间已发生了位点内或位点间的同步进化(concerted evolution)(Elder & Turner, 1995), 即不同 ITS 拷贝间的序列趋于相近或完全一致, 这就为对 PCR 扩增产物直接测序奠定了理论基础(Ainouche & Bayer, 1997; Hsiao *et al*., 1994); 第二, DNA 测序工作的难易程度及成本与 DNA 片段长度有密切关系, 裸子植物 ITS 区的长度变化范围很大(汪小全, 洪德元, 1997), 而被子植物的 ITS 区长度则比较稳定, 包括 5.8S rDNA 在内, 总长度只有 600～700 bp, 为测序带来了很大方便。同时, ITS1、ITS2 分别位于 18S-5.8S rDNA、5.8S-26S rDNA 之间, 而 18S、5.8S、26S rDNA 的序列又非常保守, 这样就可以用与它们序列互补的通用引物对 ITS 区进行 PCR 扩增、测序(Ainouche & Bayer, 1997; Hsiao *et al*., 1994), 目前研究中所用的引物即是 White *et*

al.(1990)在真菌系统学研究中设计的引物，也有作者对引物序列进行了适当调整(Sang *et al*.,1995; Wendel *et al*.,1995)(图 1)。

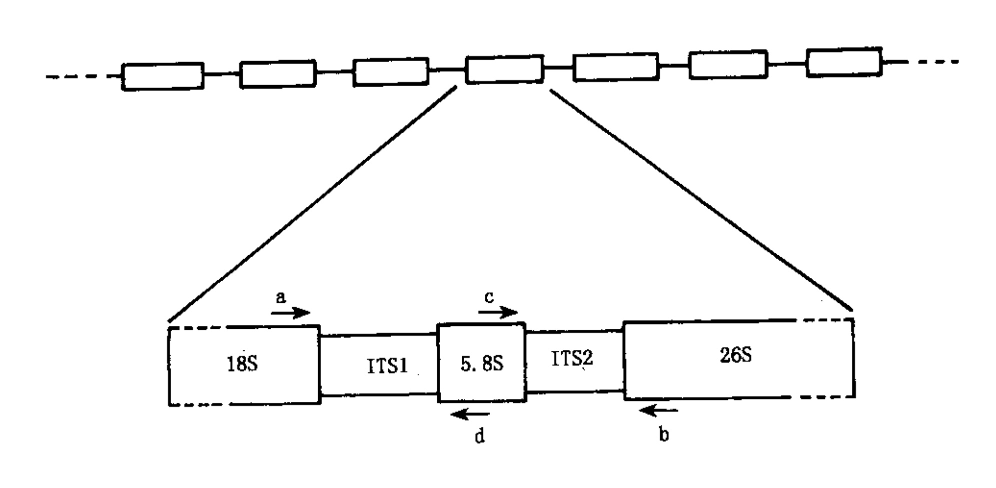


图 1　植物 18S-26S rDNA 的基本结构：箭头示 PCR 扩增和测序引物(仿 Wendel *et al*.,1995)。

Fig.1　The structure of 18S-26S rDNA in plants: the arrows denote the primers used for PCR amplification and sequencing
a = 5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′; b = 5′-TCCTCCTCC-GCTTATTGATATGC-3′;
c = 5′-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3′; d = 5′-GCTGCGTTCTTCA -TCGATGC-3′

2　ITS 区测序方法的考虑

2.1　PCR 产物直接测序？还是克隆测序？

Baldwin *et al*.(1995)曾指出，在被子植物系统发育分析中，是测定 ITS 区单一 PCR 克隆，还是直接测定 PCR 全部产物的序列更好，尚处于争论之中。如果 rDNA 重复序列间的纯合程度很高，那么，无论是克隆测序还是 PCR 产物直接测序都可反映出 ITS 区的序列，值得注意的是，PCR 扩增中有一定的随机错误(Sambrook *et al*.,1992)，如果所测克隆刚好是误扩增的序列，就会影响结果的准确性，而 PCR 产物直接测序则可避免此问题，因为测序中所表现出的信号由处于主导地位的产物所决定。相反，如果 rDNA 的纯合程度较低，各重复单位间序列差异较大，特别是当细胞中有一个以上的基因位点时，采取何种方法测序应特别慎重。只测一个 PCR 克隆的序列显然不能反映重复序列间的变异，对大量 PCR 克隆进行常规测序当然是理想方法，如 Suh *et al*.(1993)只对每一 PCR 产物的两个克隆进行测序，即发现 Winteraceae 科的 6 种植物中有 4 种植物存在重复单位间的变异，但该方法需要大量人力、物力，特别是在系统与进化研究中往往要面对大量的分类群，一般实验室难以承受。另一方面，如果 PCR 产物中不同重复序列的浓度比较平均的话，直接测序后根据测序-放射自显影带纹可直接确定重复序列间的变异情况，这些发生变异的核苷酸会在同一位点显示出来(张文驹,1998; Sang *et al*.,1995)，因此，从近几年发表的论文来看，无论所测 ITS 区的同步进化程度如何，大家基本上都是对 PCR 产物直接进行测序，即使对杂交、多倍化现象广泛存在的复杂类群，这一方法也取得了良好结果(Ainouche & Bayer,1997; Sang *et al*.,1995; Wendel *et al*.,1995)。在普通小麦多倍体复合体中，曾对克隆测序与 PCR 产物测序两种方法进行了比较，结果完全一致(张文驹,1998)。

2.2 ITS区测序的技术流程及排序、系统学分析

不同研究者对ITS序列分析的具体流程大同小异,主要包括DNA提取、PCR扩增、(克隆)、测序、排序等步骤。

2.2.1 DNA提取

常采用CTAB法(Doyle & Doyle,1987),可以从新鲜叶片、种子,甚至保存数年的腊叶标本中提取DNA。野外工作中可用变色硅胶保存材料,使其干燥,然后带回实验室提取DNA (Chase & Hills, 1991)。所提取DNA的纯度是影响测序准确性的关键因素(Baldwin *et al*.,1995)。

2.2.2 PCR扩增及产物纯化

常用图1中的引物a、b对ITS区进行扩增。引物a与18S rDNA靠ITS1的边界序列互补,引物b与26S rDNA靠ITS2的边界序列互补,这样,就可以对ITS1、5.8S rDNA、ITS2三个片段共约600~700 bp序列进行扩增,得到双链的PCR产物。经琼脂糖电泳后,PCR产物大多呈一条带,少数情况下会形成另一条弱带,这条弱带与引物用量、模板DNA纯度、扩增条件、单链DNA的产生、微生物污染等因素有关(Yuan *et al*.,1996; 张文驹,1998)。PCR产物的纯化是直接测序的关键,可用离心透析法(Sambrook *et al*.,1992)、透析袋法(张文驹,1998)、Geneclean Kit (葛颂等,1997; Hsiao *et al*., 1994)等方法对扩增产物进行纯化。也可对PCR产物进行克隆,然后测一个或多个克隆的序列。

2.2.3 测序

被子植物ITS区(包含5.8S rDNA)的长度为600~700 bp,而目前DNA测序技术一次反应所测片段长度一般为400~500 bp(叶寅等,1997),因此,需增加中间引物来测此区段全部序列,通常用图1中的引物c、d。也可用手工测序或用DNA自动测序仪,具体操作可参阅有关实验指南(叶寅等,1997)。

2.2.4 排序

用手工或计算机软件如CLUSTAL V (Higgins *et al*., 1992)或CLUSTAL W (Thompson *et al*.,1994)对所测得的序列进行排序,然后根据空位(gap)情况对排序结果进行适当调整。ITS1 & ITS2的边界可根据已发表的被子植物18S、5.8S和26S rDNA序列,以及近缘类群的ITS1、ITS2序列来确定。

2.2.5 系统学分析

在进行系统学分析之前,要先确定变异位点(variable site)和信息位点(informative site)数目。如果不同物种间在某一位点上至少有两种或两种以上的核苷酸类型,这一位点即可称为变异位点;有些变异位点上有两个或两个以上的物种具有不同的核苷酸类型,这一位点即为信息位点(Hsiao *et al*.,1994)。只有信息位点才能用于系统学分支分析,至于是否需要对转换型替换(transition)和颠换型替换(transversion)进行加权,以及是否将空格作为新性状,Hsiao *et al*.(1994)、Sang *et al*.(1994)对加权、将空格视为新性状前后的最大简约树进行了比较,结果表明树形基本一致,只是自展数据值(bootstrap)有区别。分支分析可采用简约法(parsimony method)(Swofford, 1993)、邻接法(neighbor-joining distance method)(Saitou & Nei, 1987)、最大似然树法(maximum likelihood method)(Felsenstein,1981)等方法。具体方法可参阅钟扬等(1994)。

3 ITS 区序列在被子植物系统与进化研究中的应用

3.1 ITS 区长度和序列的变化

被子植物核 rDNA 的 ITS 区包括 5.8S rDNA 在内的总长度为 600～700 bp，其中 5.8S rDNA 的长度非常保守，一般为 163 bp 或 164 bp（汪小全，洪德元，1997；Baldwin *et al*.，1995），仅在大豆属 *Glycine* 中发现其长度为 168 bp(Kollipara *et al*.，1997)，而且它的序列也很保守，在有些类群中根本没有变异(Sang *et al*.，1995)，而在另一些类群中有 1～6 个变异位点(Kollipara *et al*.，1997；Hsiao *et al*.，1994；Baldwin，1993，1992)，但信息位点最多只有 2 个(Kollipara *et al*.，1997)，因此，5.8S rDNA 提供的系统学信息有限，在研究中可不必测该片段的序列(张文驹，1998；Ainouche & Bayer，1997)。

ITS1 和 ITS2 的长度也比较保守，但核苷酸序列变化较大，可以提供丰富的系统学信息。据 Baldwin *et al*.(1995)统计，被子植物 ITS1 的长度为 187～298 bp，ITS2 的长度为 187～252 bp，1995 年之后所发表类群的长度也在上述范围之内(Shi *et al*.，1998；Wen *et al*.，1998；Kollipara *et al*.，1997；Ohoi & Kim，1997；Ainouche & Bayer，1997；葛颂等，1997；Downie & Katz-Downie，1996；Yuan *et al*.，1996；周毅等，1996；Hsiao *et al*.，1995a，1995b)。至于 ITS1 与 ITS2 的相对长度，不同类群间变化较大，在杨柳科（Salicaceae)、毛茛科(Ranunculaceae)、十字花科(Brassicaceae)、虎耳草科(Saxifragaceae)、锦葵科(Malvaceae)、花忍科(Polemoniaceae)、安息香科(Styracaceae)、柳叶菜科(Onagraceae)、五福花科(Adoxaceae)、菊科(Asteraceae)、Canellaceae 和 Winteraceae 等科中，ITS1 比 ITS2 长(汪小全，洪德元，1997；Francisco-Ortega *et al*.，1997；Baldwind *et al*.，1995)，而在桦木科(Betulaceae)、玄参科(Scrophulariaceae)、葫芦科(Cucurbitaceae)和 Viscaceae 等科中，ITS2 比 ITS1 长(汪小全，洪德元，1997；Baldwin *et al*.，1995)，在蔷薇科(Rosaceae)、蝶形花科(Fabaceae)、伞形科(Apiaceae)、龙胆科(Gentianaceae)和禾本科(Poaceae)等科中，ITS1 或者比 ITS2 长，或者比 ITS2 短，因属、种而异(Ainouche & Bayer，1997；Downie & Katz-Downie，1996；Yuan *et al*.，1996；Baldwin *et al*.， 1995)。

分类学性状的好坏与该性状所提供的信息量有密切关系，那么 ITS1、ITS2 序列的变异程度如何？在系统与进化植物学研究中是利用其中一个片段，还是将它们结合起来考虑？在目前所研究过的被子植物中，大多数类群中这两个片段所提供的信息量相近，如在禾本科 Poaceae 中，ITS1 的信息位点数是 55/235 (23.4%)，ITS2 是 60/240 (25.0%) (Hsiao *et al*.，1994)，在大豆属 *Glycine* 中，ITS1 的信息位点数是 33/240 (15.3%)，ITS2 是 26/224 (13.1%) (Kollipara *et al*.，1997)，但在有些类群中也确发现 ITS1 和 ITS2 提供的信息量不同，如雀麦属下 *Bromus* sect. *Bromus* 中，ITS1 有 49/ 218 (22.5%)的信息位点，ITS2 有 32/216 (14.8 %)的信息位点(Ainouche & Bayer，1997)，在龙胆属 *Gentiana* (Yuan *et al*.，1996)、菊科(Asteraceae)(Kim & Jansen，1994；Baldwin，1993，1992)、蝶形花科(Fabaceae)(Wojciechowski *et al*.，1993)和 Winteraceae(Suh *et al*.，1993)中还发现，虽然 ITS1 在长度和核苷酸替换方面的变异更大，但 ITS2 的信息位点比 ITS1 多。在系统学分析中，虽然单独根据 ITS1 或 ITS2 的序列也可以得出重要的系统学结论(Kollipara *et al*.，1997；周毅等，1996)，但考虑到这两个片段的长度有限，各自的信息量并不十

分充足,因此,总的来说,大多数作者在系统学分析中都是将这两个片段综合起来考虑(葛颂等, 1997;Ainouche & Bayer,1997; Ohoi & Kim,1997; Baldwin *et al*.,1995)。

3.2 在科、亚科、族水平的应用

ITS区序列在科、亚科、族内的系统发育与分类问题研究方面具有重要作用(Francisco-Ortega *et al*., 1997; Downie & Katz-Downie, 1996; Campbell *et al*., 1995; Susanna *et al*., 1995; Hsiao *et al*., 1995a,1995b,1994; Suh *et al*., 1993)。

禾本科是被子植物中最大的4个科之一,关于其分类和系统发育一直存在很大分歧。Hsiao等(1995b)对禾亚科(Pooideae) 7族19属25种植物ITS序列研究表明,7个族中,染色体较小,基数大于7的Stipeae、Meliceae和Brachypodieae 3个族逐渐分化;染色体较大,基数为7的Poeae、Aveneae、Bromeae和Triticeae形成一个单系分支,Poeae、Avenae是Bromeae和Triticeae的姐妹群。ITS系统树显示Brachypodieae与Triticeae、Bromeae的亲缘关系较近,这一点不同于基于cpDNA和形态学的系统发育分析结果,而与细胞遗传学研究结果一致。Hsiao等(1995a)还根据ITS序列进一步对小麦族18个属之间的关系进行了分析,得到了与细胞遗传学、形态学一致的结果,进一步证实ITS区序列可用于系统学分析,同时指出该片段宜用于族、属间的系统发育和分类研究,而不适于种下等级的研究。

Downie和Katz-Downie(1996)在伞形科(Apiaceae)Apiodeae亚科中还发现,分别基于ITS区序列和cpDNA的rpoC1内含子序列的系统树虽不完全一致,但比较吻合,然而前者的分辨率要比后者高得多。rpoC1内含子核苷酸的替换速率太慢,不能用于关系密切属间的系统发育分析,相反,由于ITS区序列变化速率太快,造成亲缘关系较远属间序列的高度分化,它不适用于Apiodeae亚科系统发育中祖先节点(ancestral node)的相互关系分析。

3.3 在属及属下系统学研究中的应用

关系密切的物种间ITS长度接近,而序列有一定程度的变异,因此,该片段特别适合于属、组级的系统发育和分类研究(Ainouche & Bayer,1997; Kollipara *et al*.,1997; Yuan *et al*.,1996; Sang *et al*., 1995,1994; Wojciechowski *et al*.,1993; Baldwin,1993)。

大豆属 *Glycine* 是一个具有重要经济价值的属,由18个物种组成,其中一年生的栽培大豆 *G. max* 和野生大豆 *G. soja* 组成 *Soja* 亚属,其余的16个多年生物种(均产于澳大利亚)组成 *Glycine* 亚属。野生近缘种的基因组类型是利用这些遗传资源的重要依据,根据细胞遗传学研究结果已确定了多数野生种的基因组类型,但有5个野生种在澳大利亚之外的研究地点很难诱导开花,无法进行细胞遗传学研究,这就促使人们寻找新的遗传标记,来研究它们的基因组及各物种间的亲缘关系。Kollipara等(1997)对该属18种植物的ITS序列进行了测定及系统发育分析,其结果不仅验证了已知基因组类型,还确定了5个野生种的基因组类型:*G. araenaria* (HH), *G. hirticaulis* (H_1H_1), *G. pindanica* (H_2H_2), *G. albicans* (II), *G. lactovirens* (I_1I_1)。ITS序列还支持两个亚属的划分,并且在 *Glycine* 亚属中,具F、C基因组的物种聚类在一起,其余物种(具A、B、D、E、H和I基因组)聚类在一起。

Ainouche和Bayer(1997)还对雀麦属下 *Bromus* sect. *Bromus* (包括2x、4x物种)的

ITS 进行了序列测定，简约法分析后得到的系统树表明 sect. *Bromus* 的二倍体物种是一个单系类群，更有意义的是，将异源四倍体物种 ITS 序列引入简约法分析后，并未改变系统树的拓扑结构。张文驹(1998)在普通小麦多倍体复合体中不同倍性(2x、4x、6x)物种的研究中也得到了类似结果。这两项研究所得出的系统树还显示出了多倍体与二倍体物种间的相互关系，说明 ITS 序列不但可用于二倍体物种间的亲缘关系研究，而且可用于分析多倍体物种的起源(见 3.5 节)。

3.4　种及种下水平的应用

虽然由于位点内(intralocus)、位点间(interlocus)的同步进化，在许多物种内 ITS 不存在位点多态性(site polymorphism)(Kollipara *et al*., 1997; Francisco-Ortega *et al*., 1997; Campbell *et al*., 1995; Baldwin *et al*., 1995; Hsiao *et al*., 1994; Wojciechowski *et al*., 1993)，但仍有不少报道发现 ITS 序列存在种内多态性(intraspecific polymorphism)，即不同亚种、居群的同一位点(site)有 2 或 2 个以上的核苷酸类型(Ainouche & Bayer, 1997; Downie & Katz-Downie, 1996; Buckler & Holtsford, 1996; Yuan *et al*., 1996; Sang *et al*., 1995; Suh *et al*., 1993)，有些种内多态性还可用于种、亚种间关系的分析，如在 sect. *Bromus* 中，虽然 *B. hordeaceus* ($4x=28$)等 4 种植物的不同亚种、居群间 ITS 序列完全一致，但仍发现有些物种的亚种、居群间存在位点多态性，多态位点总数为 27 个，主要是四倍体物种 *B. lanceolatus*, *B. secalinus*, *B. grossus* 和 *B. bromoideus*(Ainouche & Bayer, 1997)。这些四倍体物种内的位点多态性显示出了它们二倍体祖先基因组的差异，而正是这些现存的差异可用于多倍体物种的杂交、多倍化起源过程分析。令人惊奇的是，sect. *Bromus* 中的几个二倍体物种，特别是 *B. briziformis*, *B. japonicus*, *B. intermedius* 也显示出 1～4 个多态性位点(Ainouche & Bayer, 1997)，对这样的种内位点多态性或杂合性的解释，受到 PCR 产物直接测序方法本身的限制，可通过克隆 PCR 产物中不同重复单位，然后测序的方法来确定每一种重复单位的序列及所占比例。

3.5　在杂交和多倍化研究中的应用

杂交和多倍化是高等植物进化的最重要途径之一。被子植物中多倍体的比例约占 50%～70%，在禾本科 Poaceae 中可能超过 80% (Masterson, 1994; 洪德元, 1990; Grant, 1981)。不同倍性的植物之间形成了极为复杂的网状进化关系，要重建这种关系是一项非常困难的工作。虽然各种分子标记为认识杂交和异源多倍体提供了重要依据，但由于分子进化机制极为复杂，这方面的进展受到很大限制(McDade, 1995; Soltis & Soltis, 1993)，而 ITS 区序列的应用则为探讨这种重要而复杂的进化过程提供了契机(Ainouche & Bayer, 1997; Wendel *et al*., 1995; Sang *et al*., 1995)。

如果杂交和(或)多倍化的历史并不长，同步进化尚未使 rDNA 的重复单位间发生一致化，那么，杂种 ITS 序列就是双亲序列相加在一起，ITS 序列可以为网状进化提供直接证据。如在 *Krigia* 属中，核 rDNA 和 cpDNA 酶切图谱表明，二倍体种 *K. biflora* 和四倍体的 *K. montata* 可能是六倍体 *K. montata* 的亲本种，而 ITS 序列表明异源六倍体的 *K. montata* 中同时存在有上述二倍体、四倍体的序列，从而弄清了该物种的起源途径(Kim & Jansen, 1994)。Sang *et al*.(1995)在芍药属 *Paeonia* 中也发现双亲的 ITS 序列同时存在于二倍体或异源多倍体杂种中，他们认为杂种中保持双亲序列是因为营养繁殖所造成

的世代周期延长，而有些杂种中亲本序列的部分一致化则是基因转换的结果，ITS序列在揭示杂种起源方面可以提供重要信息。

另一方面，如果同步进化已使杂种的ITS序列一致化，则该序列可以为揭示进化机制提供重要信息，这方面的研究以Wendel等(1995)的工作最为出色。他们在棉属*Gossypium*中发现，不但二倍体物种(分别具AA、DD基因组)的ITS序列已全部一致化，而且异源四倍体物种(AADD)的同步进化也已完成或趋于完成。异源四倍体物种具有4个18S-26S rDNA位点，序列的一致化说明多倍体中的位点间同步进化已完成。更为有趣的是同步进化是双向的，有4个四倍体物种的ITS序列与D基因组物种一致，一个异源四倍体物种与A基因组一致，这进一步说明了多倍体分子进化机制的复杂性。另外，对于那些处于同步进化过程中的杂交起源类群来说，既观察不到明显的双亲ITS序列，又观察不到完全一致的序列，在分析物种间关系时要特别慎重，要结合形态学、细胞遗传学、等位酶分析、cpDNA、血清学等方面的证据才能得出结论(Ainouche & Bayer, 1997; Sang *et al.*, 1995)。

参 考 文 献

叶寅，王苏燕，田波，1997.核酸序列测定——实验室指南.北京：科学出版社.1～323

汪小全，洪德元，1997.植物分子系统学近五年的研究进展概况.植物分类学报，35(5)：465～480

陈之端，汪小全，孙海英等，1998.马尾树科的系统位置：来自*rbc*L基因核苷酸序列的证据.植物分类学报，36(1)：1～7

张文驹，1998.应用rDNA的ITS区探讨多倍体小麦的基因组起源.武汉：武汉大学博士学位论文

周毅，邹喻苹，洪德元等，1996.中国野生稻及栽培稻核糖体DNA第一转录间隔区序列分析及其系统学意义. 植物学报，38：785～791

洪德元，1990.植物细胞分类学.北京：科学出版社.150～171

钟扬，李伟，黄德世，1994.分支分类的理论与方法.北京：科学出版社.1～540

顾红雅，1994.限制性片段长度多态性(RFLPs)在植物系统与进化研究中的应用.见：陈家宽，杨继主编，植物进化生物学.武汉：武汉大学出版社.209～231

葛颂，Schaal B A，洪德元，1997.用核糖体DNA的ITS序列探讨裂叶沙参的系统位置——兼论ITS片段在沙参属系统学研究中的价值.植物分类学报，35(5)：385～395

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T著，金冬雁等译，1992. 分子克隆(Molecular Cloning). 2nd ed.北京：科学出版社.672～692

Ainouche M L, Bayer R, 1997. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. Genome, 730～743

Appels R, Honeycutt R I, 1986. rDNA: evolution over a billion years. In: Dutta S K ed. DNA Systematics. Boca Raton: CRC Press. 81～95

Badaeva E D, Friebe B, Gill B S, 1996. Genome differentiation in *Aegilops*. 2. Physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species. Genome, 39: 1150～1158

Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M *et al.*, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Missouri Bot Gard, 247～277

Baldwin B G, 1993. Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. Amer J Bot, 80: 222～238

Baldwin B G, 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. Mol Phylogenetics Evol, 1: 3～16

Buckler E S, Holtsford T P, 1996. *Zea* systematics: ribosomal ITS evidence. Mol Biol Evol, 13: 612～622

Campbell C S, Donoghue M J, Baldwin B G *et al.*, 1995. Phylogenetic relationships in Maloideae (Rosaceae): evidence from sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA and ITS congruence

with morphology. Amer J Bot, 82:903～918

Chase M W, Hills H H, 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. Taxon, 40:215～220

Cronn R C, Zhao X, Paterson A H *et al.*, 1996. Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. J Mol Evol, 42:685～705

Downie S R, Katz-Downie D S, 1996. A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Amer J Bot, 83:234～251

Doyle J J, Doyle J L, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 19:11～15

Dvorak J, Zhang H-B, Kota R S *et al.*, 1989. Organization and evolution of the 5S ribosomal RNA gene family in wheat and related species. Genome, 32:1003～1016

Elder J R, Turner B J, 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. Quart Rev Biol, 70: 297～319

Felsenstein J, 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J Mol Evol, 17:368～376

Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Hines A *et al.*, 1997. Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae). Amer J Bot, 84:1595～1613

Grant V, 1981. Plant Speciation. New York: Columbia University Press. 283～356

Hamby R K, Zimmer E A, 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In: Soltis P S, Soltis D E, Doyle J J eds. Molecular Systematics of Plants. New York: Chapman & Hall. 102～134

Higgins D G, Bleasby A J, Fushs R, 1992. ClUSTAL V: improved software for multiple sequences alignment. CABIOS, 80:109～191

Hsiao C, Chatterton N J, Asay K H, 1994. Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. Genome, 37:112～120

Hsiao C, Chatterton N J, Asay K H *et al.*, 1995a. Phylogenetic relationships of the monogenomic species of the wheat tribe, Triticeae (Poaceae), inferred from nuclear rDNA (ITS) sequences. Genome, 38:211～223

Hsiao C, Chatterton N J, Asay K H *et al.*, 1995b. Molecular phylogeny of the Pooideae (Poaceae) based on nuclear rDNA (ITS) sequences. Theor Appl Genet, 90:389～398

Jiang J, Gill B S, 1994. New 18S-26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. Chromosoma, 103:179～185

Kim K J, Jansen R K, 1994. Comparison of phylogenetic hypothesis among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*): additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. Plant Syst Evol, 157～185

Kollipara K P, Singh R J, Hymowitz T, 1997. Phylogenetic and genomic relationships in the genus *Glycine* Willd. Based on sequences from the ITS region of nuclear rDNA. Genome, 40:57～68

Masterson J, 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploid in majority of angiosperms. Science, 264:421～428

McDade L A, 1995. Hybridization and phylogenetics. In: Hoch P C, Stephenson A G eds. Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics. St. Louis: Missouri Botanical Garden. 305～331

Ohoi B H, Kim J H, 1997. ITS sequences and speciation on far eastern *Indigofera* (Leguminosae). J Plant Res, 110:339～346

Olmstead RG, Palmer J D, 1994. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. Amer J Bot, 81:1205～1224

Pillay M, Hilu K W, 1995. Chloroplast DNA restriction site analysis in the genus *Bromus* (Poaceae). Amer J Bot, 83:239～250

Pillay M, 1997. Variation of nuclear ribosomal RNA genes in *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter. Genome, 40: 815～821

Rogers S O, Bendich A J, 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the inter-

genic spacer. Plant Mol Biol, 9:509~520

Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol Biol Evol, 4:406~425

Sang T, Crawford D J, Kim S C *et al.*, 1994. Radiation of the endemic genus *Dendroseris* (Asteraceae) on the Juan Fernandez Islands: evidence from sequences of the ITS regions of nuclear ribosomal DNA. Amer J Bot, 81: 1494~1501

Sang T, Crawford D J, Stuessy T F, 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. Proc Natl Acad Sci USA, 92:6813~6817

Sastri D C, Hilu K, Appels R *et al.*, 1992. An overview of evolution in plant 5S rDNA. Plant Syst Evol, 183: 169~181

Second G, Wang Z Y, 1992. Mitochondrial DNA RFLP in genus *Oryza* and cultivated rice. Genet Resour Crop Evol, 39:125~140

Shi S H, Chang H T, Chen Y Q *et al.*, 1998. Phylogeny of the Hamamelidaceae based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Biochemical Systematics and Ecology, 26:55~59

Soltis D E, Soltis P S, 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploid. Crit Rev Plant Sci, 12:243~273

Suh Y, Thien L B, Reeve H E, 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. Amer J Bot, 80: 1042~1055

Susanna A, Jacas N G, Soltis D E *et al.*, 1995. Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences. Amer J Bot, 82:1056~1068

Swofford D L, 1993. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony version 3.1. Illinos Natural History Survey, Champain

Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res, 22:4673~4680

Wang Z-Y, Second G, Tanksley S D, 1992. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. Theor Appl Genet, 83:565~581

Wen J, Shi S-H, Jansen R K *et al.*, 1998. Phylogeny and biogeography of *Aralia* sect. *Aralia* (Araliaceae). Amer J Bot, 85:866~875

Wendel J F, Schnabel A S, Seelanan T, 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). Proc Natl Acad Sci USA, 92:280~284

White T J, Bruns T, Lee S *et al.*, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. San Diego, California: Academic Press. 315~322

Wojciechowski M F, Sanderson M J, Baldwin B G *et al.*, 1993. Monophyly of aneuploid *Astragalus* (Fabaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA sequences. Amer J Bot, 80:711~722

Wolfe K H, Li W-H, Sharp P M, 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, choroplast, and nuclear DNAs. Proc Natl Acad Sci USA, 84:9054~9058

Yuan Y-M, Kupfer P, Doyle J J, 1996. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* inferrred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. Amer J Bot, 83:641~652